GEN-PROBE

LIFECODES

LIFECODES HLA EZ Type coffret (A/B/C Low, DR/DQ Low)

REF LR-ABC, LR-DRDQ

IVD

CE 0843

Réactifs: ABC (303371)
DR/DQ (303372)

E-Gels (303370)

TABLE DES MATIÈRES

UTILISATIONS PRÉVUES **2**
SOMMAIRE ET EXPLICATION **2**
PRINCIPE **2**
COMPOSITION DU COFFRET **2**
PRÉCAUTIONS **3**
AVERTISSEMENTS **3**
ÉCHANTILLONS **3**
MODE OPÉRATOIRE **4**
Matériel fourni 4
Matériel nécessaire non fourni 4
Procédure 4
CONTRÔLE DE QUALITÉ **7**
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS **7**
LIMITES DE LA TECHNIQUE **7**
PERFORMANCES SPÉCIFIQUES **7**
RÉFÉRENCES **8**

UTILISATIONS PRÉVUES

LIFECODES HLA EZ Type coffret est un essai permettant la détermination des allèles HLA de Classe I et de Classe II à faible résolution, en utilisant une amplification PCR d'ADN génomique humain.

A/B/C Low pour le typage des locus A, B, et C de Classe I
DR/DQ Low pour le typage des locus DR et DQ de Classe II

SOMMAIRE ET EXPLICATION

La méthode établie pour la détermination des antigènes HLA a été pendant des années le test de lymphotoxicité. Cependant, avec l'avènement des technologies de PCR, les techniques de typage des antigènes HLA par l'ADN sont devenues courantes dans le laboratoire. Par rapport aux méthodes sérologiques, les analyses par PCR simplifient l'interprétation des résultats grâce à leur capacité de distinguer des changements d'un seul nucléotide. De plus, les réactifs synthétiques des analyses par PCR permettent à la fois d'améliorer la stabilité des composants et de diminuer la variation d'un lot à l'autre.

La plupart des tests de typage HLA sont des méthodes à étapes multiples: l'étape d'amplification des régions HLA est suivie par une étape de séparation indépendante (méthodes RFLP ou SSOP) et une étape de détection finale. En revanche, l'analyse par PCR-SSP augmente la rapidité de l'essai et diminue le temps de manipulation. La méthode PCR-SSP ne demande que deux étapes de travail (amplification et détection) parce que l'amplification et la séparation se passent pendant la PCR. La détection par électrophorèse en gel d'agarose achève l'analyse. Cette utilité inhérente à l'analyse est encore augmentée par l'inclusion dans le système de gels d'agarose précoulés.

PRINCIPE

Cette analyse est basée sur la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) qui permet un enrichissement (amplification) en séquences d'ADN définies. Après la réussite de l'amplification, l'échantillon contient la séquence de l'ADN cible en quantité suffisante pour pouvoir être détectée. L'amorce Séquence Spécifique (SSP) décrit un type spécifique de PCR dans laquelle l'amplification ne se produit que si l'allèle est présent. Les échantillons ne contenant pas la cible pour un ensemble d'amorces spécifiques d'un allèle ne produisent pas ce produit particulier de la PCR. L'analyse par PCR-SSP demande par conséquent la réalisation en parallèle d'un certain nombre d'amplifications. Dans le programme "Touch Down Program" décrit dans la procédure de l'analyse, une période de dénaturation initiale est suivie de 10 cycles de PRC à deux températures avec une température d'hybridation élevée (65°C) qui garantit une amplification spécifique de toutes les réactions SSP. Viennent ensuite 20 cycles d'une PCR à trois températures avec une température d'hybridation basse qui favorise une amplification supplémentaire des produits spécifiques de la PCR. L'amplification des amorces d'un contrôle interne ciblant l'hormone de croissance humaine (HGH) prouve les bonnes conditions de réaction pour chacun des tubes de PCR. Les tubes de contrôle négatif détectent la contamination en ADN exogène, si elle existe. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose sur des E-Gels précoulés. Pendant l'électrophorèse, les produits de la PCR sont également colorés par du bromure d'éthidium. Les produits séparés sont ensuite examinés sur un transilluminateur à ultraviolet (UV). Un enregistrement de l'analyse peut être réalisé sous la forme d'une image photographique sur pellicule ou numérique. La détermination des allèles est réalisée en enregistrant les bandes spécifiques des allèles à partir de l'image du gel sur le tableau de résultats incluse. Le modèle des bandes spécifiques des allèles est alors comparé aux modèles des bandes des tables d'interprétation.

COMPOSITION DU COFFRET

Nombre maximal de tests par coffret:

- **A/B/C Low: 8 typages par coffret , 96 réactions**
- **DR/DQ Low: 24 typages par coffret , 32 réactions**

All reagents should be stored as directed by the label.

	REF	
PP	A/B/C Low: 403906 DRDQ Low: 403907	**Plaque d'Amorce:** plaque de PCR de 96 tubes avec des amorces spécifiques des allèles HLA et des amorces de contrôle interne (HGH) lyophilisées sur la surface interne. La plaque est scellée par une feuille de couverture. Prêt à l'emploi.
HLAPR	403908	**Réactif HLA PCR:** un tampon contenant du chlorure de magnésium, des désoxynucléotides triphosphates libres (dNTPs), du glycérol, du rouge de crésol, et autres composants de marque. À diluer avant utilisation
E-Gel	403909	**E-Gel**: gels d'agarose préfaits (96 puits, 2%) utilisés pour la séparation de produits de PCR. Prêt à l'emploi.

PRÉCAUTIONS

- Ne pas utiliser les réactifs ou gels au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser les réactifs qui sont troubles ou contaminés.
- Ne pas utiliser un réactif de PCR HLA (HLA PCR Reagent) qui a changé de couleur et a viré du rouge au jaune.
- Ne pas utiliser les gels qui apparaissent craquelés, secs ou semblent avoir été congelés ou contaminés.
- Les tubes PCR et les réactifs inclus dans ce coffret ne doivent pas être utilisés conjointement avec des autres trousses.
- Etant donné variations de performance des différents thermocycleurs, le laboratoire devra peut-être établir des paramètres ajustés pour le programme du thermocycleur afin d'obtenir des résultats valides. Il faudra peut-être également adapter le joint d'espacement approprié pour assurer la fermeture complète de la feuille de scellage pendant la PCR.
- La préparation de l'amplification peut se réaliser sur la paillasse à température du laboratoire (20-25ºC). Une température plus élevée pourrait entraîner des artéfacts. Si tel était le cas, le master mix et la plaque contenant les primers devraient être maintenu sur une plaque froide ou sur de la glace pendant la préparation.
- Ne pas isoler l'échantillon d'ADN à partir de sang hépariné. L'héparine peut interférer avec l'amplification PCR.
- La PCR est couverte par les licences de Roche Molecular Systems et F. Hoffman LaRoche Ltd. Pour plus d'informations sur les licences pour utiliser la PCR, contacter (aux Etats-Unis) le Directeur des Licences chez Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, ou (en-dehors des Etats-Unis) le Responsable des Licences PCR, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr.124, CH-4070 Basel, Suisse.

La pratique PCR dans le laboratoire

- La PCR est une méthode extrêmement puissante qui permet d'amplifier même la plus petite quantité d'ADN. Les plus grandes précautions sont à respecter pour éviter les contaminations, liées notamment aux produits des PCRs antérieures. Éviter la contamination par le produit de la PCR d'amplifications antérieures est d'une importance particulière. Les précautions suivantes sont extrêmement importantes:
  - Séparation spatiale de la zone pré-PCR (isolement et conservation de l'ADN, mise en place de la PCR) et de la zone post-PCR (thermo-cycleur, chargement des gels et électrophorèse, évaluation). Les instruments et les consommables des zones post-PCR ne doivent entrer dans la zone pré-PCR.
  - Utiliser des pipettes avec une protection aérosole (embouts filtrés stériles) à la fois dans la zone pré-PCR et dans la zone post-PCR.
  - Le test de contrôle négatif (CN, tube de PCR n° 1 pour les trousses DR/DQ; tubes 1, 25, 73 pour les A/B/C) est un contrôle environnemental destiné à détecter la contamination par de l'ADN et doit toujours être réalisé en parallèle avec les amplifications des échantillons.

AVERTISSEMENTS

- Lorsque l'essai est terminé, jeter le matériel comme déchet dangereux et décontaminer le matériel réutilisable avec 10% de javel ou un autre agent inactivateur d'ADN.
- Le transilluminateur UV utilisé pour visualiser les bandes des amplicons émet une forte lumière ultraviolette, ce qui peut endommager les yeux et la peau. Toujours porter des habits protecteurs et des verres ou écran bloquant les UV lors de cette opération.
- Les E-Gel contiennent une petite quantité de bromure d'éthidium comme colorant ADN. Le bromure d'éthidium est un mutagène humain connu. Ne pas ouvrir les cassettes de gel. Utiliser les gels selon les règlements locaux en vigueur.

ÉCHANTILLONS

Isoler l'ADN en utilisant une méthode publiée ou une trousse commerciale destinée à cet effet.

Resuspendre l'ADN dans de l'eau stérile ou dans 10 mM de Tris, pH 8,0 – 9,0. Les échantillons ne doivent pas être réhydratés dans des solutions contenant plus de 0,5 mM d'EDTA ou d'autres agents chélateurs. Ceci peut interférer avec la PCR.

Les échantillons d'ADN peuvent être testés immédiatement après l'isolement ou conservés dans un congélateur possédant un système de décongélation automatique à -20^{o}C ou plus pour une période étendue (jusqu'à 6 ans) sans affecter les résultats.

Les échantillons d'ADN devraient être dilués à une concentration de 12.5 – 100 ng/µL, avec un ratio 260 nm/280 nm $\geq$ 1,60.

La présence de contaminants, de protéine, d'ARN, héparine, EDTA ou autres agents chélateurs peut interférer avec l'amplification PCR d'ADN purifié.

MODE OPÉRATOIRE

Matériel fourni

(Emballage pour conservation à ≤ -20ºC) : ABC (303371) ; DR/DQ (303372)

1. Huit plaques de 96 tubes avec code de couleur, scellées par des feuilles de couverture adhésives marquées. Elles contiennent les amorces spécifiques de l'allèle HLA et les amorces du contrôle interne.
2. 4 x 700 µL Réactif HLA PCR

TSF

3. 9 x feuilles de thermosoudure (403905)

(Emballage pour conservation de 15 à 25°C) : (303370)

1. 8 x 2% E-Gel

Silicone Spacer Pad (1 mm). Non inclus dans la trousse; fourni dans l'envoi.

Matériel nécessaire non fourni

Pour la PCR

- Taq Polymérase, native ou recombinante, 5 U/µL. Ne pas utiliser d'autres polymérases thermostables ou préparations de Taq polymérase "hot start". Les enzymes suivantes ont été validées pour être utilisées avec le HLA EZ Type coffret. L'utilisation d'autres enzymes doit être validée par l'utilisateur.

Fournisseur	Produit
Applied Biosystems	AmpliTaq recombinant Taq polymerase
Promega	GoTaq Flexi DNA Polymerase
Genaxis	AxiTaq

- Thermocycleur programmable avec bloc acceptant 96 tubes PCR de 0,2 mL.
- Micropipettes ajustables pour distribuer 1-1000 µL avec des embouts filtrés stériles
- Eau DNA- et DNase-free
- Bain de glace ou blocs refroidissant pour tubes de 0,6 mL ou 1,5 mL tubes et tubes PCR 0,2 mL
- Portoir pour tubes PCR (0,2 mL)
- Vortex
- Tubes coniques en polypropylène (0,5 – 1,7 mL), DNA- et DNase-free
- 10% javel ou autre agent inactivateur d'ADN
- Appareil de thermosoudure
- Rouleau de scellement

Pour l'électrophorèse et l'analyse

- E-Base Motherbase
- Portoir pour tubes PCR (0,2 mL)
- Micropipettes ajustables pour distribuer 1-20 µL avec des embouts filtrés stériles
- Papier absorbant pour table de laboratoire
- Transilluminateur UV
- 10% javel ou autre agent inactivateur d'ADN
- Eau désionisée ou distillée
- Système de documentation des gels

En option

- Un marqueur de poids moléculaire ADN (405517)
- Pipettes multicanaux à 8 ou 12 canaux capables de délivrer 5 à 20 µL
- Bloc froid ou bain de glace permettant de recevoir les plaques PCR de 0.2 mL (voir Précautions)

Procédure

Á l'avance

1. Isoler l'ADN génomique de tous les échantillons à tester. Chaque échantillon doit avoir une concentration d'ADN entre 12,5 et 100 ng/µL, avec un ratio 260 nm/280 nm entre $\geq$ 1,60.

2. Programmer le thermo-cycleur avec le programme HLA EZ Type coffret PCR qui est le même pour toutes les trousses HLA EZ Type coffret. Ce programme est le suivant:

96º C	120 secondes	
96º C	15 secondes	
65º C	60 secondes	10 cycles

96º C	15 secondes	
61º C	50 secondes	20 cycles
72º C	30 secondes	
4º C	Maintenu	

NOTE: Ce programme de cycles a été testé avec des thermocycleurs d'Applied Biosystems (PE9700, PE9600, PE2720), Bio-Rad (PTC-100, PTC-200) et Eppendorf (Mastercycler, Mastercycler EP). La vitesse de rampe sur des cycleurs plus rapides (Mastercycler, Mastercycler EP, PTC-200, PE9700 avec bloc en or-en argent) doit être ajustée de 1,0 à 1,5^{0}/sec pour la chauffage et le refroidissement.

PCR

3. Allumer le thermocycleur à l'avance afin de s'assurer que le couvercle chauffant a le temps d'atteindre la température opérationnelle. Vérifier le programme pour être sûr qu'il n'a pas changé.

4. Préparer les surfaces de travail et les pipettes en les nettoyants avec de l'eau de javel 10% ou un autre agent inactivateur d'ADN.

5. Déterminer le nombre d'échantillons à tester. Retirer les plaques d'amorce ou les morceaux de plaques nécessaires, la Taq polymérase et suffisamment de réactif de PCR du congélateur et les dégeler à température ambiante. Garder tous les réactifs sur de la glace ou dans un bloc réfrigéré.

6. Allumer l'appareil de thermosoudure et lui permettre d'atteindre la température opérationnelle (~ 5 à 7 min).

7. Utiliser le tableau de formulation du mélange maître (tableau 2 ci-après) pour préparer un mélange maître pour tous les échantillons.

NOTE : La préparation de l'amplification peut se réaliser sur la paillasse à température du laboratoire (20-25ºC). Une température plus élevée pourrait entraîner des artéfacts. Si tel était le cas, le master mix et la plaque contenant les primers devraient être maintenu sur une plaque froide ou sur de la glace pendant la préparation.

	Préparation du mélange maître			**Élimination du contrôle négatif et addition de l'ADN**			
Nombre de tubes par typage	**Eau DNA- et DNase-free (µL)**	**Réactif HLA PCR (µL)**	**Taq poly-mérase (µL)**	**Volume Total du Master Mix (µL)**	**Volume restant après addition aux tubes de contrôle négatif (µL)**	**Echantillon ADN (µL)**	**Volume final du mélange PCR de l'échant-illon (µL)**
Pour les échantillons dans la fourchette de 25 à 100 ng/µL							
24	163	81	2.2	246.2	236.2	26	262.2
32	219	108	3.0	330	320	35	355
48	310	154	4.5	468.5	458.5	50	508.5
96	638	319	8.5	965.5	935.5	103	1038.5
Pour les échantillons dans la fourchette de 12,5 à 25 ng/µL							
24	137	81	2.2	220.2	210.2	52	262.2
32	184	108	3.0	295	285	70	355
48	260	154	4.5	418.5	408.5	100	508.5
96	535	319	8.5	862.5	832.5	206	1038.5

8. Retirer et jeter le film de scellement de la plaque d'amorce ou du morceau de la plaque d'amorce. Pipeter 10 µL du mélange PCR dans le(s) tube(s) du contrôle négatif (comme indiqué sur le tableau de résultats) AVANT d'ajouter la quantité requise de l'échantillon d'ADN au mélange maître.

9. Ajouter l'échantillon d'ADN au mélange maître PCR. Bien mélanger et pipeter 10 µL du mélange PCR de l'échantillon dans chacun des tubes de la plaque PCR correspondant au format de typage (31 tubes pour le DR/DQ Low, 93 tubes pour le A/B/C Low). Faire attention à ne pas ajouter un échantillon supplémentaire au(x) tube(s) du contrôle négatif.

10. Placer la plaque d'amorce sur le fond du portoir de l'appareil de thermosoudure. Centrer une feuille de thermosoudure sur le dessus de la plaque d'amorce. Orienter la feuille de sorte que le coin avec l'encoche soit sur le coin **inférieur gauche** de la plaque. Si l'on scelle un morceau de plaque, couper la feuille pour l'ajuster à bonne grandeur avant de sceller. Garder le reste de la feuille pour un autre essai.

NOTE: Les feuilles de thermosoudure ont une face permettant le scellage qui doit être orientée vers le bas (vers la plaque d'amorce) pour que le scellement soit correct. Le coin de la feuille de scellage avec l'encoche représente un repère visuel facilitant la bonne orientation. Si la feuille est coupée pour être ajustée à un morceau de plaque, s'assurer de conserver le morceau de feuille restant de manière à ce que l'orientation soit connue. Sceller avec la mauvaise face orientée vers le bas entraînera une fuite du tube et un échec possible de l'analyse.

11. Une fois la feuille de thermosoudure correctement positionnée, abaisser l'élément chauffant sur la plaque et appuyer pendant 3 à 5 secondes. Relâcher l'élément chauffant et lui permettre de se relever. Utiliser immédiatement le rouleau de scellage pour faire adhérer fermement la feuille à la plaque. Retirer la plaque de l'appareil de thermosoudure.

NOTE: Une durée de scellage de plus de 5 secondes ou une pression excessive pendant l'opération de scellage peut réduire l'ouverture des tubes de PCR, rendant difficile la récupération des produits amplifiés.

12. Examiner les tubes PCR après la mise en place de la feuille de thermosoudure. Si nécessaire, déloger les bulles dans le fond des tubes PCR. Forcer les gouttes se trouvant sur la paroi à aller dans le volume de réaction. Cela peut être fait en tapant délicatement les tubes sur la table ou par une brève centrifugation dans une centrifugeuse pour microplaque.

13. Démarrer le programme HLA EZ Type coffret sur le thermocycleur. Transférer la/les plaque(s) d'amorce de la glace ou du bloc refroidissant vers le bloc du thermocycleur.

14. Placer le Silicone Spacer Pad fermement sur la feuille adhésive de couverture pour couvrir chaque tube; soyez certain d'aligner le pad correctement et soyez sûr que le pad ne se déplace pas lors de la fermeture du couvercle chauffant. Fermer le couvercle conformément aux instructions du fabricant du thermocycleur.

15. Lorsque le thermocycleur a atteint la dernière étape du programme (maintien à 4°C), enlever les tubes des plaques d'amorce du thermocycleur et les transférer sur un portoir de tube PCR. Inspecter chacun des tubes et noter ceux dont le volume paraît faible. Une perte de volume peut entraîner une mauvaise amplification dans ces tubes. Si l'électrophorèse n'est pas faite directement, conserver les tubes au frigo (2 à 8^{o}C) jusqu'à 3 jours ou au congélateur (< –20^{o}C) jusqu'à 7 jours.

Détection

NOTE: Les étapes de détection doivent avoir lieu dans une zone séparée de celle utilisée comme zone pré-PCR. Les appareils ne doivent pas être partagés entre ces zones afin d'éviter des contaminations croisées.

16. Si les tubes PCR ont été congelés, les enlever du congélateur et les dégeler avant utilisation.

17. Préparer une zone de travail en mettant du papier absorbant et mettre en place le E-Base Motherbase, l'eau désionisée et les pipettes.

18. Enlever le E-Gel de son sachet et enlever le peigne. Nettoyer la partie supérieure du gel avec un tissu de laboratoire humide si nécessaire.

19. Noter la partie supérieure de la plaque du gel avec un marqueur.

20. Pipeter 16 µL d'eau désionisée dans chaque puits du gel excepté pour le puits M.

21. Si vous souhaitez utiliser un DNA ladder pipeter le volume nécessaire et completer avec de l'eau si nécessaire pour obtenir un volume final de 15 à 20 µL.

22. Perforer la feuille adhésive du premier tube de PCR (tube A1) et pipeter 6 µL dans le puits correspondant du E-Gel. Répéter ce processus pour chacun des tubes de PCR et leur puits correspondant sur le gel. Changer d'embout de pipette après chaque transfert.

NOTE: Ce processus est grandement facilité par l'utilisation d'une pipette multicanaux de 8 ou de 12 canaux capable de délivrer un volume allant de 5 à 20 µL.

23. Brancher la Motherbase. Un signal lumineux rouge va apparaître et le chronomètre s'allume. Utiliser le bouton power (bouton droit) pour basculer vers le mode EG (au lieu du mode EP).

24. Glisser le gel sous les deux électrodes de l'E-Base de la Motherbase et placer le gel de sorte que ses électrodes fassent contact avec les électrodes de l'appareil.

25. Utiliser le bouton gauche jusqu'à atteindre 9 minutes. Appuyer sur le bouton power (bouton droit) pour commencer l'électrophorèse. Le signal rouge va tourner au vert pendant que la migration est en cours.

26. A la fin de l'électrophorèse, le signal vert va changer en un signal rouge flash et une alarme va retentir. Appuyer sur le bouton power pour arrêter la migration. Le signal rouge flash deviendra un signal rouge stable. Débrancher l'appareil et enlever le gel de la Motherbase.

27. Placer le gel sur le transilluminateur UV pour l'observation des bandes. Le gel doit être regardé et enregistré endéans les 20 minutes. Si un enregistrement de l'essai est désiré, une photo du gel doit être prise en utilisant un système de documentation de gels.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un produit de PCR de l'un des sets d'amorces de contrôle interne (430 bp, 800 bp ou 1070 bp, en fonction du tube de PCR) doit être détecté pour chaque amplification sauf pour le contrôle négatif. Cependant, l'amplification spécifique de l'allèle est en compétition avec le contrôle interne PCR de sorte que, dans les amplifications positives pour les réactions spécifiques du HLA, le produit du contrôle interne peut être faible ou absent. Ceci n'est pas inquiétant. Cependant, si de l'ADN a été incorporé dans un tube PCR et qu'aucune bande contrôle ou bande spécifique de l'allèle ne sont observées dans cette ligne, l'échec d'amplification est fortement indiqué. De tels échecs d'amplification peuvent résulter de la détérioration d'un réactif, d'une mauvaise programmation du protocole PCR sur le thermocycleur, d'un échantillon ADN pauvrement purifié, d'une quantité insuffisante d'ADN chargée lors de la PCR, d'une perte de volume dans un tube de PCR mal scellé ou d'une erreur de pipetage d'un réactif lors de la réalisation de la PCR.

La ligne du contrôle négatif ne doit pas contenir de bandes de produits PCR. La présence d'amplicon spécifique dans la ligne du contrôle négatif indique une contamination par de l'ADN du mélange maître.

Pour chaque essai HLA EZ Type coffret, des amorces pour un contrôle interne plus large du produit de la PCR sont inclues dans certains tubes de PCR. Ces tubes sont répartis, en suivant un schéma, dans toute la plaque d'amorce. Ce schéma est noté sur la feuille d'enregistrement de l'essai et peut être comparé aux bandes du contrôle interne sur le gel pour vérifier la validité du chargement du gel.

Les procédures internes de contrôle qualité sont à appliquer.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les produits de la PCR observés par transillumination UV sont composés de produits spécifiques du HLA, de produits du contrôle interne, et, rarement, d'artéfacts non spécifiques. Pour tous les tubes, le produit du contrôle interne est le plus important: les produits de la PCR spécifiques du HLA et les artéfacts sont toujours inférieurs en taille au contrôle interne Se référer au tableau des commentaires en page 5 de la feuille de résultats des documents du lot pour avoir de l'information sur les bandes d'artéfacts non spécifiques, les amplifications multiplexes, les réactions faibles et les éventuelles réactions croisées. Ces commentaires sont spécifiques pour chaque lot. Enregistrer les bandes spécifiques des allèles sur la grille de la feuille d'enregistrement incluse. Noter les tubes positifs sur le tableau d'interprétation approprié. Utiliser les modèles des tableaux d'interprétation pour déterminer les allèles présents pour chaque locus testé.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

- HLA EZ Type coffret contient des matériaux pour l'amplification de séquences d'ADN génomique par PCR et la détection qualitative ultérieure de séquences spécifique de l'allèle HLA de classe I et de classe II par électrophorèse de gel d'agarose. Des variations inconnues dans les séquences de gène peuvent affecter les résultats.
- Pour assurer des résultats optimaux avec l'essai HLA EZ Type coffret, les échantillons d'ADN doivent avoir une concentration entre 12,5 ng/µL et 100 ng/µL avec un ratio 260 nm/280 nm $\geq$ 1,60. Une faible amplification peut résulter d'une quantité insuffisante d'ADN ajoutée à la réaction PCR, ou d'un échantillon d'ADN pauvrement purifié.
- Des résultats faux-négatifs peuvent résulter d'échantillons mal manipulés, d'erreurs de procédure, d'inhibiteurs d'amplification ou d'échantillons d'ADN pauvrement purifié.
- Des résultats faussement négatifs peuvent provenir de l'utilisation d'une autre enzyme polymérase de l'ADN que celles listées dans **Matériel requis** (mais non fourni).
- Une contamination d'acides nucléiques, d'ADN génomique chargé en excès lors de l'amplification, ou une mauvaise utilisation des températures indiquées, peut provoquer des résultats faux-positifs.
- Cet essai a été démontré fonctionnant correctement lorsque l'amplification est pratiquée en utilisant les thermocycleurs PE 9600, PE 9700 et PE 2720 (Perkin Elmer/Applied Biosystems), le PTC-100 et PTC-200 (BioRad) et le Mastercycler and Mastercycler EP (Eppendorf). Quelques ajustements au niveau des paramètres du programme peuvent être requis lors d'une utilisation avec d'autres thermocycleurs.
- Les thermocycleurs doivent être calibrés et entretenus en accord avec les instructions du fabriquant.
- Les résultats de cet essai ne doivent pas être utilisés comme le seul fondement d'un jugement clinique.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

NOTE : Les amorces pour chaque locus de Classe I et de Classe II sont les mêmes pour tous les produits HLA EZ Type coffret. Par conséquent, les caractéristiques de performances ici décrites pour les analyses A/B/C Low et DR/DQ Low s'appliquent à toutes les trousses HLA EZ Type coffret de faible résolution.

Précision

La précision de l'essai HLA EZ Type coffret a été évaluée par 3 études comparatives différentes:

Comparaison du HLA EZ Type coffret avec un essai de typage moléculaire ADN
Cinquante échantillons couvrant une large gamme d'allèles des HLA de Classe I et 51 échantillons couvrant une large gamme d'allèles des HLA de Classe II ont été génotypés avec l'essai HLA EZ Type coffret A/B/C Low ou DR/DQ Low. Les échantillons ont également été testés pour des allèles de Classe I ou de Classe II avec une autre méthode de faible résolution PCR de typage moléculaire dans une évaluation indépendante externe. La corrélation entre les deux méthodes a été de 100% pour la classe I avec une limite basse de l'intervalle de confiance à 95% de 0,942 (95% de probabilité que la corrélation soit d'au moins 94,2%). Et de 100% pour la classe II avec une limite basse de l'intervalle de confiance à 95% de 0,943 (95% de probabilité que la corrélation soit d'au moins 94,3%).

Dans la deuxième étude, 52 échantillons couvrant un large panel d'allèles de classe I et II on été typés avec les kits HLA EZ Type coffret A/B/C Low ou DR/DQ Low. Les échantillons ont également été testés par une technique basée sur la PCR, en basse résolution dans certains cas, en haute résolution dans d'autres. La correlation entre les techniques pour l'ensemble des échantillons a été de 100% pour les deux classes. La limite basse de l'intervalle de confiance à 95% a été de 0,944 pour les deux comparaisons 95% de probabilité que la corrélation soit d'au moins 94,4%.

Comparaison des résultats du HLA EZ Type coffret au séquençage ADN
Trente échantillons couvrant une large gamme d'allèles HLA de Classe I ou de Classe II ont été testés avec l'essai HLA EZ Type coffret A/B/C Low or DR/DQ Low. Les résultats ont été comparés aux résultats d'un génotypage HLA de haute résolution (séquençage ou PCR SSP de haute résolution). La concordance entre les deux méthodes était de 100%.

Précision de l'essai

La reproductibilité de l'essai HLA EZ Type coffret a été déterminée. En résumé, deux échantillons représentant une rangée d'allèles ont été testés dans 20 essais séparés pour l'essai A/B/C Low; pour le DR/DQ Low deux échantillons ont été testés trois fois dans 10 essais différents. Les résultats démontrent 100% de concordance inter-séries et, pour le DR/DQ, intra-série.

RÉFÉRENCES

1. Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and –D antigens. American Journal of Clinical Pathology 1978; 69: 103 - 120
2. Mullis KB, Faloona F: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. Meth. Enzymology. 1987;155:335-350
3. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 1989; 17:2503-2516.
4. Olerup O, Zetterquist H: HLA DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 1992; 39:225-235.
5. Bunce M, O´Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). Tissue Antigens 1995; 46:355-367.
6. Bunce M, Young NT, Welsh KI: Molecular HLA Typing – The brave new world. Transplantation 1997; 64:1505-1513.
7. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. Tissue Antigens 2002; 60:407-464.

Gen-Probe Incorporated
20925 Crossroads Circle
Waukesha, WI 53186 USA

EC REP
Qarad b.v.b.a
Cipalstraat 3,
B-2440 Geel
Belgium

US and International Contact Information:
Customer Service : customerservice@gen-probe.com
Technical Support : technicalsupport@gen-probe.com

www.gen-probe.com

© 2005-2013 Gen-Probe Incorporated

303371.IFUFR Rev C
2013-03-22